

シュードモナス属細菌由来のTn4651型トランスポゾンの転移機構

著者	源河 浩之
号	778
発行年	2003
URL	http://hdl.handle.net/10097/17030

氏 名(本籍)	げん 源	か 河	ひろ 浩	ゆき 之
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)			
学 位 記 番 号	農 博 第 7 7 8 号			
学位授与年月日	平 成 16 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	農学研究科環境修復生物学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	シュードモナス属細菌由来の Tn4651 型トランスポゾン の転移機構			
論文審査委員	(主 査)	教 授	津 田 雅 孝	
	(副 査)	教 授	南 澤 究	
		教 授	東 谷 篤 志	

論文内容要旨

序論

現在までに数多くの細菌ゲノムの塩基配列が決定された。近縁な細菌株間のゲノムの比較から、細菌のゲノムは様々なタイプの転移因子によって起源を異にする遺伝子を獲得することによって形成されてきたことが明らかになりつつある。細菌の転移因子のひとつである Tn3 に代表される Tn3 型トランスポゾン上には、自らの転移を触媒する遺伝子や薬剤耐性遺伝子など様々な遺伝形質が担われている。Tn3 型トランスポゾンは両末端に約 40 bp の逆向き反復配列 (Inverted Repeats, IRs) を持ち、転移酵素(TnpA)が IRs に作用してトランスポゾンの倍加を伴う融合体が形成される前半過程と、融合体上で倍加しているトランスポゾン内の組換え部位(*res*)間での解離酵素が触媒する部位特異的組換え反応からなる後半過程によって転移が完結する (Fig. 1)。 *Pseudomonas putida* mt-2 株が保有するプラスミド pWW0 上のトルエン分解遺伝子群は、56 kb の Tn4651 内に存在していることが見出されていた。Tn4651 は、他の Tn3 型トランスポゾンと同様な過程を経て転移するが、転移関連遺伝子群が既知の Tn3 型トランスポゾンとは互換性を示さず、部位特異的解離反応には、*res* の両側に存在する具体的機能が不明の *tnpS* と *tnpT* の両遺伝子産物を必要とする点で特殊である。そこで本研究では、Tn4651 の転移の分子機構の詳細を明らかにすることを目的として研究を行った。

第1章 Tn4651 の部位特異的解離系を支配している領域の解析

Tn4651 の部位特異的解離系を支配している約 2.4 kb の領域の塩基配列を決定した。*tnpS* と *tnpT* は本領域の中央部分に存在する 203 bp の *res* 内からそれぞれ外向きの転写方向を持ち、それぞれ 322 と 332 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしていると推定された (Fig. 2)。データベースの相同性検索の結果、TnpS は部位特異的組換え酵素のチロシンリコンビナーゼファミリーと局所的に高い相同性を示したが、TnpT は機能を推定できるようなタンパク質との相同性は認められなかった。mt-2 株から抽出した全 RNA を用いたプライマー伸長反応の結果、*tnpS* と *tnpT* の転写開始点は予想開始コドンのそれぞれ 99 bp と 140 bp 上流に存在することが判明した。さらに、*res* 内には 9 bp からなる 1 対の逆向き反復配列(IRs)が見出された (Fig. 3)。

第2章 大腸菌を用いた部位特異的解離の解析

Tn4651 の融合体解離過程の分子機構解明のための実験を大腸菌 *recA* 株背景下

で実施した。同方向に配向した 2 つの *res* 間にカナマイシン(Km)耐性遺伝子を挿入したプラスミド pGEN101 [Km^r, Tc^r(テトラサイクリン耐性)] を構築した。pGEN101 を保有している大腸菌株に、*tnpS* か *tnpT*、あるいは両遺伝子をクローニングしたアンピシリン(Ap)耐性プラスミドをそれぞれ導入し、Ap と Km、Tc を含む LB 寒天培地上に塗布した。一定時間の培養後、*tnpS* と *tnpT* の両遺伝子を供給したときにのみ Km 感受性株が出現した (Table 1)。Km 感受性となった大腸菌誘導体株では、pGEN101 上の 2 つの *res* 間での部位特異的組換えの結果生じたプラスミド(pGEN101R)が検出できた (Fig. 4)。*tnpS* あるいは *tnpT* のどちらか一方の遺伝子のみを供給したときには、pGEN101R を検出できなかった (Fig. 4)。TnpS のインテグラーゼモチーフ内の予想活性中心のチロシン残基に変異を導入した *tnpS* を、*tnpT* とともに供給した場合には 2 つの *res* 間での組換えは観察できず (Fig. 4)、解離反応における TnpS のチロシン残基の必須性が判明した。また、複製能のない *res-kan* カセットがもうひとつの解離産物として生じていることを (Fig. 5)、Km 耐性遺伝子の内側から外向きに設計した 2 つのプライマーを用いた PCR で確認した。*tnpS* のみを供給し解離プラスミドが検出できなかった大腸菌誘導体株からの粗抽出液を鋳型とした PCR でも、*res-kan* カセットの存在を示す 1 kb の DNA が増幅したことから (Fig. 6)、2 つの *res* 間での分子内部位特異的組換えには TnpT は必須ではないが、その高効率化に必要であることが明らかになった。

第 3 章 *tnpS-res-tnpT* 領域の部位特異的組込み能の解析

tnpS と *tnpT* が異分子上に存在する 2 つの *res* 間での部位特異的組込み反応を触媒できるかの解析を行った。大腸菌 DH5 α に、それぞれ 1 コピーの *res* を保持する 2 種類のプラスミドを導入した。1 つは自己伝達能がある Km 耐性プラスミドで、もう一つは Tc 耐性遺伝子を担い、接合遺伝子や伝達起点(*oriT*)をもたないプラスミドである。これら 2 種類のプラスミドを保持している DH5 α 誘導体株に、*tnpS* や *tnpT* をクローニングしたプラスミドを導入し、ストレプトマイシン(Sm)耐性の大腸菌 HB101 株を受容菌とした接合伝達反応を行い、Km,Sm,Tc を含んだ LB 寒天培地上に塗布した。2 つのプラスミド上の *res* 間で部位特異的組込みが生じた場合にのみ Tc 耐性プラスミドが受容菌に伝達されることが期待できる (Fig. 7A)。供与菌の DH5 α 誘導体株内で *tnpS* を供給した場合には、供給しなかった場合と比べて 1,000 倍高い頻度で Tc 耐性 HB101 接合体株が出現した (Table 2)。Tc 耐性 HB101 接合体株は、供与菌株内の 2 つのプラスミド上にそれぞれ存在する *res* 間での分

子間組換えの結果生じた融合プラスミドを保持していた。(Fig. 7B)。また、TnpT の供給はその頻度に影響を及ぼさなかった。これらの結果から、TnpS のみが異分子上に存在する 2 つの *res* 間における分子間組換えに必要であることが判明した。

第 4 章 Tn4651 群トランスポゾンの転移関連遺伝子群の分布

Tn4651 の転移機構は、上述のように既知のトランスポゾンとは大きく異なっていることから、最近 Tn4651 を代表とする新しい転移因子のグループ、Tn4651 群トランスポゾンが創設されるに至っている。Tn4651 群トランスポゾンはこれまでに Tn4651、Tn4676 と Tn5401 の 3 つの報告しかなく、それらはいずれも *Pseudomonas* 属細菌株から単離されてきた。Tn4651 群トランスポゾンの環境細菌中における分布を調べるために、様々な細菌株由来の全 DNA を用いたサザン解析を実施した。その結果、Tn4651 の *tnpA* や *tnpS-tnpT* 断片と相同な DNA 領域を保持していた菌株は 75 株中 20 株存在し、主に *Pseudomonas* 属細菌中に広範に存在していることが明らかになった。また、データベースの相同性検索の結果、Tn4651 の部位特異的解離系に類似した領域が γ -proteobacteria の各種細菌株由来のプラスミドや染色体上にコードされていることが判明した。さらに、不和合性群 IncP-7 に属する緑膿菌由来の Sm 耐性プラスミド Rms148 上に、Tn4651 の *tnpA* や *tnpS-tnpT* と相同性の高い DNA 領域が存在していることが判明した。一方、チロシンリコンビナーゼの系統樹を作製した結果、酵素群がひとつの TnpS を含む Tn4651 群トランスポゾンの転移を触媒しているグループに分類できた (Fig. 8)。

第 5 章 IncP-7 プラスミド Rms148 上の新規 Tn4651 群トランスポゾン

緑膿菌由来の薬剤耐性プラスミド Rms148 上の *tnpA* および *tnpS-tnpT* と高い相同性を示した DNA 断片の塩基配列を決定した。その結果、Tn4651 の IRs と相同性の高い 46 bp の DNA 配列 (Fig. 9) に挟まれた 11 個の遺伝子 (Fig. 10) を含む、約 13 kb の領域を見出した。Tn4651 の転移関連遺伝子群と相同性の高い領域を含む 13 kb の領域はトランスポゾンとして挙動する可能性が考えられたため、Tn4661 と命名した。また、Rms148 上の Tn4661 挿入部位近傍には、IncP-7 に属するカルバゾール分解プラスミド pCAR1 の複製・維持を司る遺伝子群と相同性の高い領域が存在していた (Fig. 11)。

緑膿菌株背景下での Tn4661 の転移を検討するために、緑膿菌 PAO1(Rms148)に

転移の標的として非自己伝達性のゲンタマイシン(Gm)耐性プラスミドを導入し、ナフタレン分解緑膿菌 PaK1 株を受容菌とした接合伝達反応を行った。出現した Gm 耐性の PaK1 接合体株から抽出したプラスミドを解析した結果、標的プラスミドに Tn4661 の転移を確認することができた (Fig. 12)。

第 6 章 Tn4661 の部位特異的組換え機構の解析

Tn4661 の部位特異的解離系の解析は、第 2 章と同様な系を構築して行った。Tn4661 由来の 2 つの *res*_{Tn4661} 間での部位特異的解離は、*tnpS*_{Tn4661} と *tnpT*_{Tn4661} の両方を供給した時に 100 % の頻度で検出することができた。*tnpS*_{Tn4661} は 2 つの *res*_{Tn4661} 間での分子間組換えも Tn4651 の *tnpS* と同様な頻度で触媒することができたが、*res*_{Tn4651} と *res*_{Tn4661} 間における部位特異的組込み頻度は約 10 倍低くなった。異なるプラスミド上にそれぞれクローニングした *res*_{Tn4651} と *res*_{Tn4661} の組換えによって形成された融合プラスミドを解析した結果、TnpS が触媒する部位特異的組換えの crossover 部位は *res* 内の IRs を含む 20 bp 以内の配列に存在することが判明した。

要約

- 1) Tn4651 上の *tnpS* と *tnpT* の両遺伝子産物が 2 つの *res* 間での高効率の部位特異的解離に必要であることが判明した。
- 2) TnpS のみが、2 つの *res* 間での部位特異的組込み反応に必要であることを明証した。
- 3) Tn4651 の転移関連遺伝子群は、*Pseudomonas* 属細菌株に広範に分布していることを見出した。
- 4) 緑膿菌由来の薬剤耐性プラスミド Rms148 上に Tn4651 群の新規トランスポゾン Tn4661 を発見した。
- 5) *res*_{Tn4651} と *res*_{Tn4661} の組換え実験によって、TnpS が触媒する組換えの crossover 部位はそれぞれの *res* 内の IRs を含む 20 bp 以内の配列に存在することが判明した。

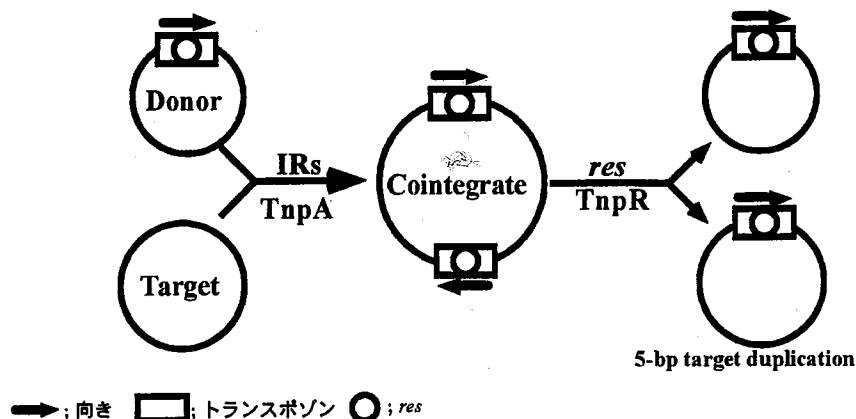


Fig. 1 Tn3型トランスポソンの転移機構

転移の前半過程では、転移酵素(TnpA)がトランスポソンの両末端のIRsを認識し、標的レプリコンとの間でトランスポソンの倍加を伴う融合体(cointegrate)が形成される。後半過程では、融合体上で倍加しているトランスポソン内の res 間での解離酵素(TnpR)が触媒する部位特異的解離反応によって、それぞれ1コピーのトランスポソンを保持する2つのレプリコンに分離する。

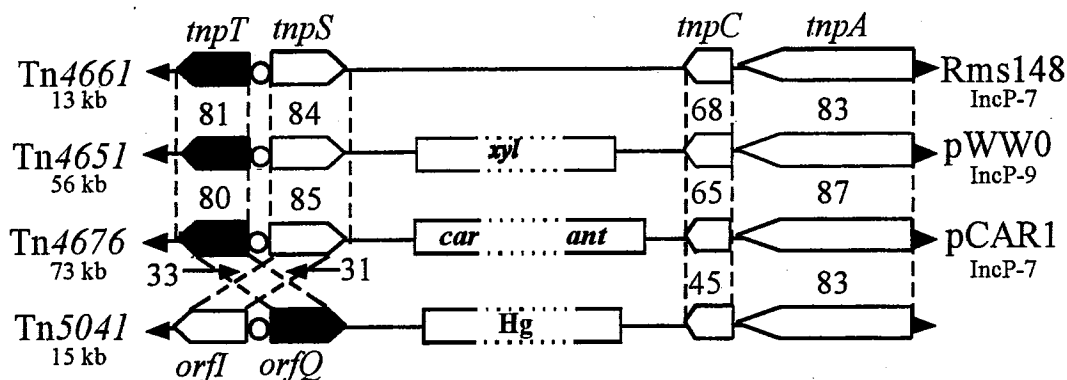


Fig. 2 Tn4651群トランスポソンの転移関連遺伝子群の比較

Tn4661は本研究過程で見出された新規トランスポソン。 $tnpC$ は $tnpA$ の発現調節遺伝子である。数字はアミノ酸レベルでの相同性(%)を示す。両脇に各トランスポソンの大きさと由来を記した。 car と ant , カルバゾール分解遺伝子群; Hg, 水銀耐性遺伝子群; xyl , トルエン分解遺伝子群。

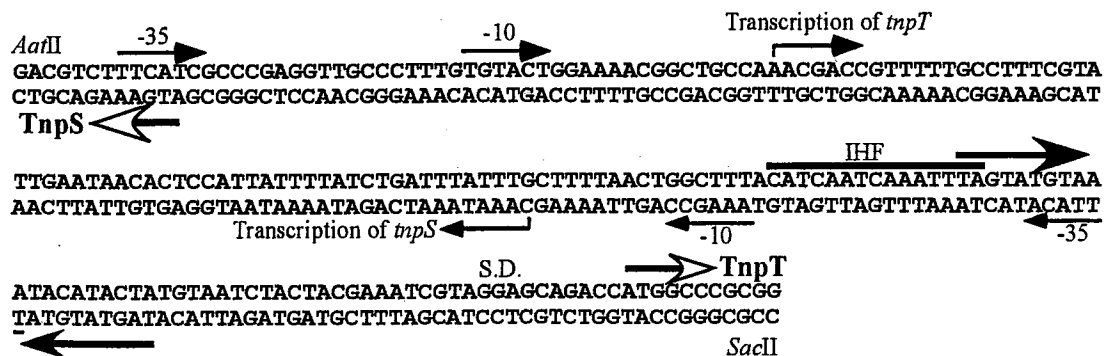


Fig. 3 res の配列

過去の遺伝学的解析で見出された203 bpの res (AafII-SacII 断片)の配列を示した。プライマー伸長解析の結果判明した $tnpS$ と $tnpT$ の転写開始点、予想プロモーター配列とS.D.配列、9 bpから成る1対のIR、予想されるIHF結合部位をそれぞれ図示した。

Table 1 カナマイシン感受性株の出現頻度

<i>res</i>	遺伝子の有無		Km ^r 株出現頻度 (%)	
	<i>tnpS</i>	<i>tnpT</i>	+IPTG	-IPTG
<i>res1</i>	-	-	0	0
<i>res1</i>	-	+	0	0
<i>res1</i>	+	-	0	0
<i>res1</i>	+	+	11.5	9
<i>res1</i>	M	-	0	0
<i>res1</i>	M	+	0	0
<i>res2</i>	+	+	9	5
<i>res3</i>	+	+	0	0
<i>res6</i>	+	+	0	0

M, 変異*tnpS*

res1, Fig. 3に示した203bpの断片

res2, *res1*を*SacII*側から43 bp削った断片

res3, *res1*を*SacII*側から73 bp削った断片

res6, *res2*を*AatII*側から65 bp削った断片

Fig. 4 Tn4651の部位特異的解離系の解析

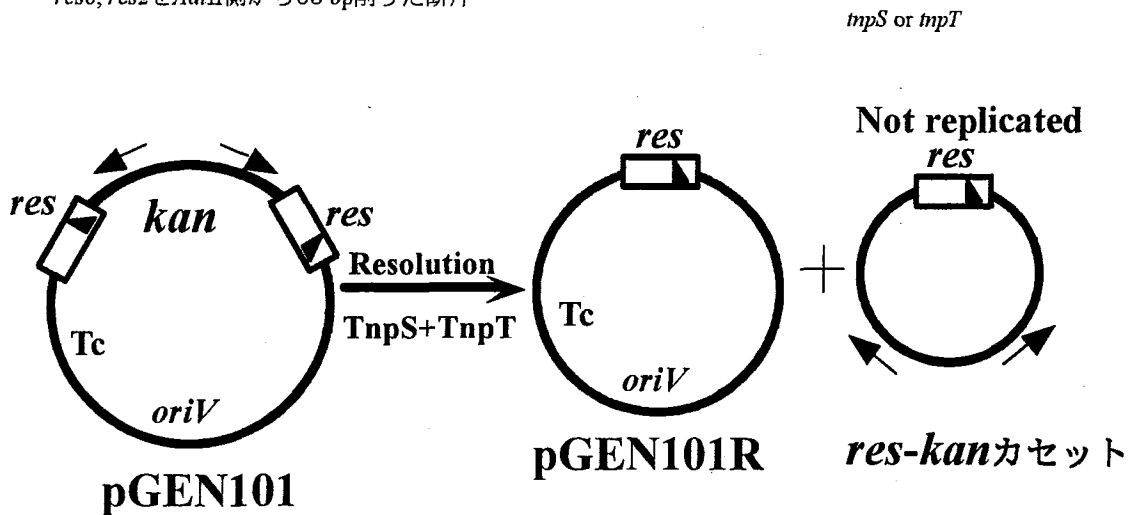
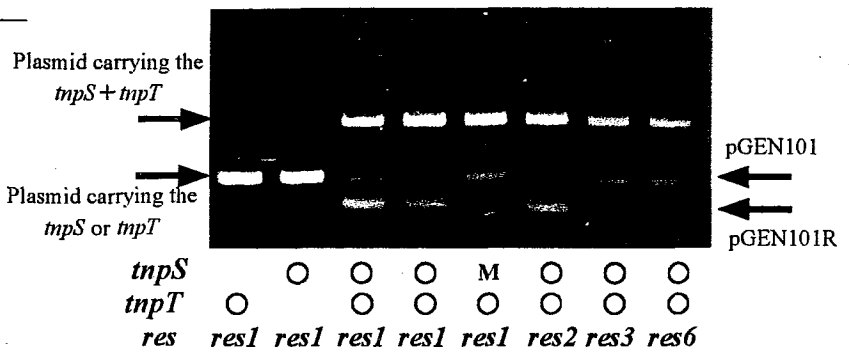


Fig. 5 pGEN101上の2つの*res*間での部位特異的組換え

TnpSとTnpTを供給することによってpGEN101はそれぞれ1コピーの*res1*を保持するpGEN101Rと*res-kan*カセットに解離する。pGEN101Rはプラスミドとして複製・維持されるが、*res-kan*カセットは複製起点を持たないため細胞内に維持されることはない。*res-kan*カセットは、Km耐性遺伝子から外向きに設計したプライマーを用いたPCRによって約1.0 kbのDNA断片として検出することができる。プライマーの位置を矢印で示した。*kan*; Km耐性遺伝子。

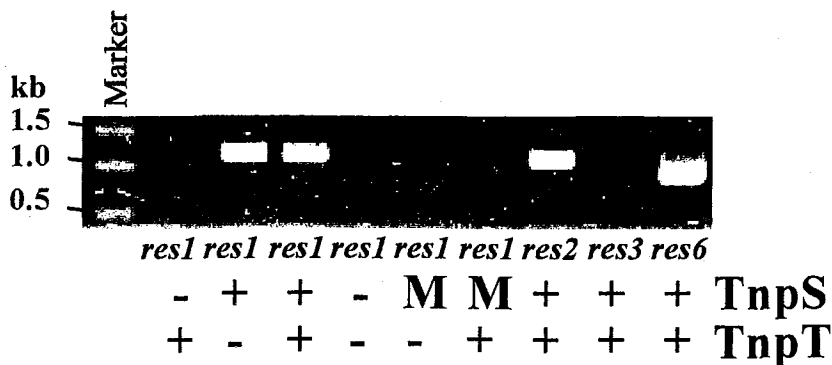


Fig. 6 *res-kan*カセットのPCRによる検出

各々のJM109誘導体株由来の粗抽出液を用いたPCR後、0.6%アガロースゲル中で電気泳動した。
M, 変異*tnpS*

Table 2 部位特異的組込み頻度

Expt.	Tra ⁺ plasmid ^a	Tra ⁺ plasmid ^a	Hepler plasmid		Mobilization of Tra ⁺ plasmid ^b
			<i>tnpS</i>	<i>tnpT</i>	
1	pMT299	pGEN388	-	-	$<1.0 \times 10^{-7}$
2			-	+	$<1.0 \times 10^{-7}$
3			+	-	$<1.0 \times 10^{-7}$
4			+	+	$<1.0 \times 10^{-7}$
5	pGEN101R	pGEN388	-	-	9.0×10^{-7}
6			-	+	1.0×10^{-6}
7			+	-	3.7×10^{-3}
8			+	+	4.7×10^{-3}
9			Y293F	+	9.0×10^{-7}
10	pGEN102R	pGEN389	-	-	2.9×10^{-6}
11			+	-	3.7×10^{-4}
12	pMT299res6	pGEN389	-	-	$>1.0 \times 10^{-7}$
13			+	-	3.7×10^{-4}

^a *res1* は pGEN101R と pGEN388 上に、*res2* は pGEN102R と pGEN389 上に、*res6* は pMT299res6 上にクローニングした。

^b Tc 耐性の HB101 接合体株数を Km 耐性 HB101 接合体株数で割った値を示した。

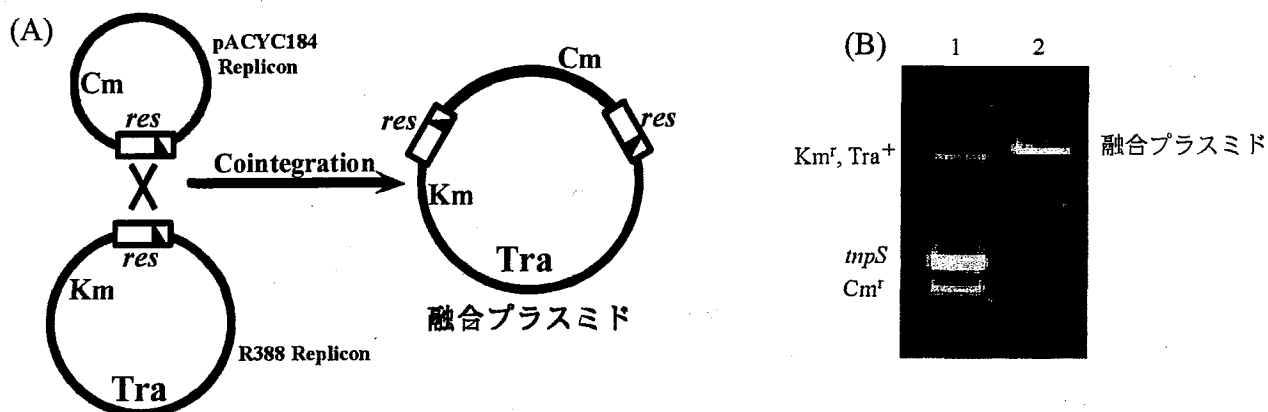


Fig. 7 部位特異的組込み反応の解析系

A; 互いに不和合性群が異なり1コピーの*res*をクローニングしたプラスミドを同一大腸菌細胞内に共存させた。非自己伝達性プラスミドのみが受容菌に接合伝達されることはない。それぞれのプラスミド上に存在する2つの*res*間で部位特異的組込み反応によって融合プラスミドが形成されたときのみ、Cm耐性プラスミドは受容菌に伝達され、それはマーカーとしてCm耐性遺伝子を用いて追跡することができる。B; Lane 1; 接合伝達反応の供与菌から抽出したプラスミド。同一大腸菌細胞内に不和合性群の異なる3つのプラスミドが共存している。Lane2; 接合伝達反応の結果出現したCm耐性HB101 接合体株から抽出したプラスミド。

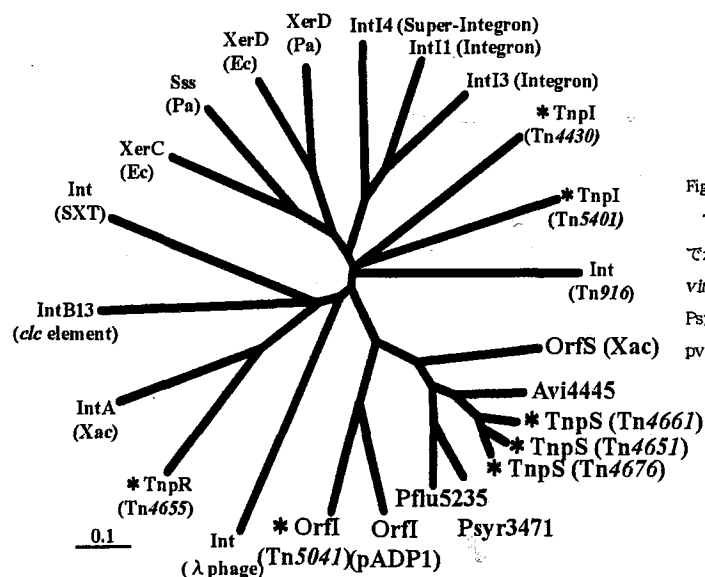


Fig. 8 チロシンリコンビナーゼの系統樹

Tn3型トランスポソンの転移の後半過程の融合体解離を触媒する酵素を*で示した。それぞれのタンパク質の由来は括弧に記した。Avi, *Azotobacter vinelandii*; Ec, *E. coli*; Pa, *P. aeruginosa*; Pflu, *P. fluorescens* Pfo-1; Psyr, *P. syringae* pv. tomato DC3000; Xac, *Xanthomonas axonopodis* pv. citri.

Tn4651 L: GGGGGGCATGCCGAGATAAGGCAAAAATTAGAACATTCGTTCTCTAA
R: ---TT-----G-----G---
Tn4661 L: -----GGG-----CATT-----T-G---G---
R: -----GG-----CATT-----T-GAA-----
Tn4676 L: ---C-----A-----C---CA-CTCTCC---C
R: -----A-----C---C---C-CTC-----

Fig.9 Tn4651型トランスポゾンのIRの比較
便宜上、*tnpA*に隣接したIRをIRRとした。Tn4651のIRLと同じ配列は-で表した。

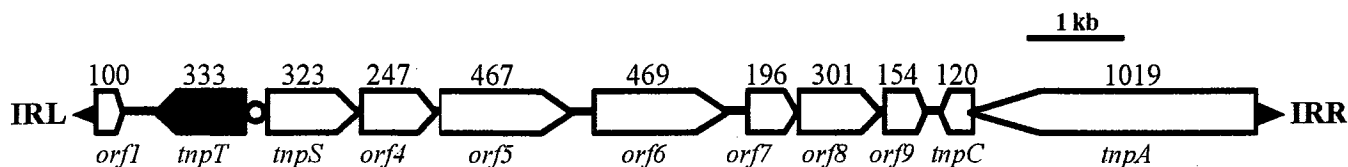


Fig. 10 Tn4661の遺伝子地図
各遺伝子名とアミノ酸残基数を示した。

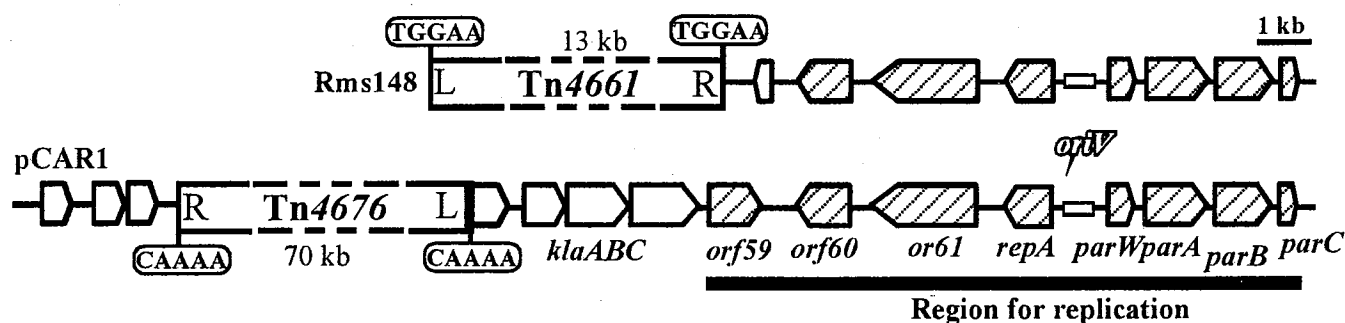


Fig. 11 Rms148上の塩基配列を決定した領域とpCARとの比較
Rms148とpCAR1の複製・維持に必要と予想される遺伝子を斜線で、予想oriVを図示した。トランスポゾンの名称と大きさ、5 bpの標的配列の重複を枠で囲み、*tnpA*側をR、その反対側をLとした。

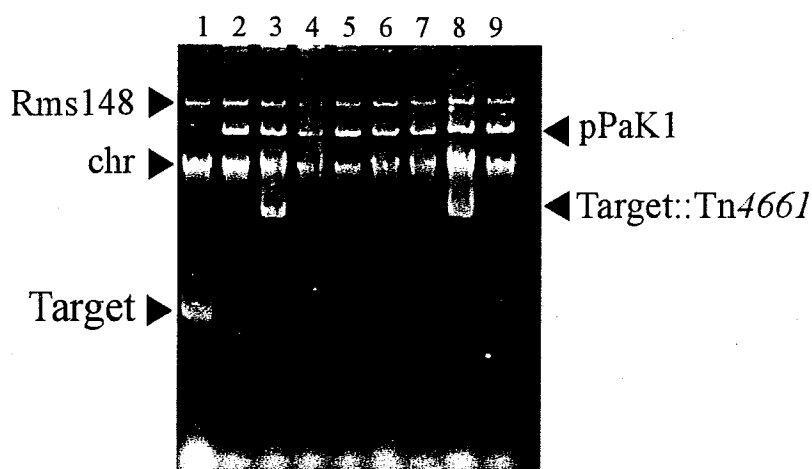


Fig. 12 緑膿菌株を用いたTn4661の転移実験
供与菌や接合体株から抽出したプラスミドを0.6 %アガロースゲルを用いて電気泳動した。プラスミドを抽出した菌株は以下の通り、lane 1, PAO1 (Rms148)(Target); 2~8, Gm耐性PaK1接合体株。pPaK1はPaK1株がもともと保持しているプラスミドである。

論文審査結果要旨

細菌の病原遺伝子や薬剤耐性遺伝子、重金属耐性遺伝子群などの多くは可動性遺伝因子上に存在していることが多い。*Pseudomonas* 属細菌由来のプラスミド pWWO 上のトルエン分解遺伝子群は 56kb の Tn3 型トランスポゾン Tn4651 上に存在することが知られていた。Tn4651 は、他の Tn3 型トランスポゾンと同様、融合体形成過程と融合体解離過程を経て転移する。しかし、Tn4651 は、融合体形成過程を触媒する転移酵素 (TnpA) が他のトランスポゾンとの相同性が低く、部位特異的解離反応には約 2.4kb の領域内に存在する *tnpS* と *tnpT* の両遺伝子産物を必要とする点がユニークであった。これらの特徴から、最近新しい転移因子のグループ Tn4651 群トランスポゾンが創設されるに至っている。本研究では、遺伝学的に未解明な点が多い Tn4651 の転移機構を明らかにすることを目的とし、さらに、Tn4651 群トランスポゾンの様々な細菌株における普遍的分布についての解析を行った。

Tn4651 の部位特異的解離系を支配している 2.4kb の DNA 領域の塩基配列を決定した結果、*tnpS* と *tnpT* はそれぞれ 323 と 332 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしていると予想された。プライマー伸長解析によって、*tnpS* と *tnpT* は、2.4kb の中央部分に存在する 203bp の組換え部位 (*res*) に内在するプロモーターから転写されることが判明した。また、TnpS にはチロシンリコンビナーゼファミリーで高度に保存されているモチーフが存在した。部位特異的解離系の解析の結果、Tn4651 の融合体解離過程には *tnpS* と *tnpT* 両遺伝子産物が必要であることが判明した。また、TnpS は、異分子上に存在する 2 つの *res* 間での分子間組換えに関与していることを突き止めた。TnpS の特定のアミノ酸残基に部位指定突然変異を導入した遺伝子を用いた解析によって、部位特異的組換えにおいては TnpS が主要な役割を担っていることが判明した。これまでにほとんど報告例がない Tn4651 の転移関連遺伝子群を保持している菌株が、 γ -proteobacteria に広範に存在していることを見出し、本トランスポゾンの遺伝子の水平伝播における重要性がはじめて認識できた。さらに、緑膿菌由来の薬剤耐性プラスミド Rms148 上に、13kb の新規 Tn4651 群トランスポゾン Tn4661 の存在を見出し、Tn4661 は大腸菌と緑膿菌内で転移可能なトランスポゾンであることを示した。Tn4651 と Tn4661 の TnpS や TnpT, *res* を組合わせた実験によって、TnpS が触媒する部位特異的組換え反応の crossover 部位は、*res* 内の 20bp 以内であることが実証できた。

以上のように、本研究は遺伝学的に未解明な点が多かった Tn4651 群トランスポゾンの転移機構や環境細菌中での動態をはじめて明らかにし、微生物学の発展に重要な知見を付与した。したがって、審査員一同は、本研究者に博士 (農学) の学位を授与するに値するものと認定した。